

THÈSE

DE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

GILLES LEGRAND

Né le 17 Avril 1904, à Paris (Seine)

*CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
d'une Méthode pratique d'ajustement
des milieux de Culture*

Président de Thèse : M. le professeur BESANÇON

MARCEL VIGNE, ÉDITEUR
13, RUE DE L'ÉCOLE DE MÉDECINE, 13
PARIS

—
1930

THÈSE

DE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

GILLES LEGRAND

Né le 17 Avril 1904, à Paris (Seine)

*CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
d'une Méthode pratique d'ajustement
des milieux de Culture*

Président de Thèse : M. le professeur BESANÇON

MARCEL VIGNE, ÉDITEUR
13, RUE DE L'ÉCOLE DE MÉDECINE, 13
PARIS

1930

I. — PROFESSEURS

<i>Le Doyen</i>	M. ROGER.
	MM.
Anatomie	ROUVIERE.
Anatomie médico-chirurgicale et chirurgie expérimentale	CUNEO.
Physiologie	ROGER.
Physique médicale	STROHL.
Chimie médicale	DESGREZ.
Bactériologie	LEMIERRE.
Parasitologie et histoire naturelle médicale	BRUMPT.
Pathologie et thérapeutique générales....	BAUDOUIN.
Pathologie médicale	CLERC.
Pathologie chirurgicale	N.
Anatomie pathologique	ROUSSY.
Histologie	CHAMPY.
Pharmacologie et matière médicale	TIFFENEAU.
Thérapeutique	LOEPER.
Hygiène et Médecine préventive	TANON.
Médecine légale	BALTHAZARD.
Histoire de la médecine et de la chirurgie.	MÉNÉTRIÉR.
Pathologie expérimentale et comparée....	RATHERY.
Hydrologie thérapeutique et climatologie..	MAURICE VILLARET
	{ CARNOT.
Clinique médicale	{ BEZANÇON.
	{ ACHARD.
	{ MARCEL LABBÉ.
Hygiène et clinique de la première enfance.	LEREBOULLET.
Clinique des maladies des enfants	NOBECOURT.
Clinique des maladies mentales et des ma- ladies de l'encéphale	H. CLAUDE.
Clinique des maladies cutanées et syphili- tiques	GOUGEROT.
Clinique des maladies du système nerveux	GUILLAIN.
Clinique des maladies infectieuses	TEISSIER.
	DEL BET.
Clinique chirurgicale	{ HARTMANN.
	{ LEJARS.
Clinique ophtalmologique	{ GOSSET.
Clinique urologique	{ TERRIEN.
	{ LEGUEU.
Clinique d'accouchements	{ COUVELAIRE.
	{ BRINDEAU.
Clinique gynécologie	{ JEANNIN.
Clinique chirurgicale infantile et orthopé- die	{ J.-L. FAURE.
Clinique thérapeutique médicale	OMBRÉDANNE.
Clinique oto-rhino-laryngologique	VAQUEZ.
Clinique thérapeutique chirurgicale	SEBILEAU.
Clinique propédeutique	PIERRE DUVAL.
Clinique de la Tuberculose	SERGENT.
Professeur sans chaire	LÉON BERNARD.
	MAUCLAIRE.



II. — AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM.

Neurologie et Psychiâtrie.....	ALAJOUANINE.
Pathologie médicale.....	AUBERTIN.
Pathologie médicale.....	BÉNARD HENRI.
Physiologie.....	BINET.
Chimie biologique.....	BLANCHETIERE.
Pathologie chirurgicale.....	BROCQ.
Pathologie médicale.....	BRULÉ.
Pathologie chirurgicale.....	CADENAT.
Pathologie médicale.....	CATHALA.
Pathologie médicale.....	CHABROL.
Pathologie médicale.....	CHEVALLIER.
Pathologie chirurgicale.....	DE GAUDAR D'ALLAINES.
Physique.....	DOGNON.
Pathologie médicale.....	DONZELOT.
Obstétrique.....	ECALLE.
Urologie.....	FEY.
Pathologie expérimentale.....	GARNIER.
Bactériologie.....	GASTINEL.
Pathologie chirurgicale.....	GATELLIER.
Histologie.....	GIROUD.
Pathologie médicale.....	HARVIER.
Anatomie.....	HOVELACQUE.
Pathologie médicale.....	HUTINEL.
Hygiène.....	JOANNON.
Chimie biologique.....	LABBÉ HENRI.
Parasitologie.....	LAROCHE GUY.
Oto-rhino-laryngologie.....	LEMAITRE.
Anatomie Pathologique.....	LEROUX.
Pathologie chirurgicale.....	LEVEUF.
Pathologie médicale.....	LIAN.
Pharmacologie.....	MERCIER FERNAND.
Pathologie chirurgicale.....	MONDOR.
Pathologie médicale.....	MOREAU.
Pathologie chirurgicale.....	MOULONGUET.
Pathologie chirurgicale.....	MOURE.
Histologie.....	MULON.
Anatomie Pathologique.....	OBERLING.
Anatomie.....	OLIVIER.
Médecine légale.....	PIÉDELIEVRE.
Obstétrique.....	PORTES.
Pathologie chirurgicale.....	QUENU.
Physiologie.....	RICHERT Fils.
Dermatologie et syphiligraphie.....	SEZARY.
Pathologie médicale.....	VALLÉRY-RADOT.
	(Pasteur)
Obstétrique.....	VAUDESCAL.
Ophtalmologie.....	VELTER.
Histologie.....	VERNE.
Obstétrique.....	VIGNES.

III. — AGRÉGÉS RAPPELÉS A L'EXERCICE

POUR LE SERVICE DES EXAMENS

Pharmacologie	MM. BUSQUET.
Obstétrique	{ GUENIOT. LEQUEUX.
Parasitologie	NEVEU-LEMAIRE.
Physique	ZIMMERN.
Obstétrique	DEMELIN.

IV. — AGRÉGÉS CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE

(ANNEXE)

A TITRE PERMANENT

Clinique chirurgicale.....	MM. ALGLAVE.
Clinique chirurgicale.....	AUVRAY.
Clinique chirurgicale.....	CHEVASSU.
Clinique médicale.....	LAIGNEL-LAVASTINE.
Clinique obstétricale.....	LE LORIER.
Clinique médicale.....	LÉRI.
Clinique chirurgicale.....	MOCQUOT.
Clinique chirurgicale.....	PROUST.
Clinique chirurgicale.....	SCHWARTZ.

V. — CHARGÉS DE COURS

Chargé du cours de chirurgie orthopédique chez l'adulte pour les accidentés du travail, les mutilés de guerre et les infirmes adultes.....	MM. MAUCLAIRE, agrég.
Stomatologie	FREY.
Education physique.....	CHAILLEY-BERT.
Radiologie clinique.....	LEDoux-LEBARD.
Puériculture	WEILL-HALLE.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A LA MEMOIRE DE MON PERE

A MA CHERE MAMAN

à qui je dois tout.

A MES SCEURS ET A MON FRERE

MEIS ET AMICIS

A M. LE PROFESSEUR BEZANÇON

Professeur de clinique médicale

Membre de l'Académie de Médecine

*qui nous a fait le grand
honneur de présider no-
tre thèse.*

A MES MAITRES DANS LES HOPITAUX

PROFESSEUR GOSSET, PROFESSEUR WIDAL
(1924-1925)

DOCTEUR ENRIQUEZ (1925-26)

PROFESSEUR AGREGE NOEL FIESSINGER
(1926-1927)

PROFESSEUR MARFAN (1926-27)

DOCTEUR A. COMTE (1927-28)

PROFESSEUR AGREGE LEVY-SOLAL (1928-29)

DOCTEUR APERT (1928-29)

A MON MAITRE, M. LE DOCTEUR COMTE

Médecin de l'hôpital Saint-Antoine

témoignage de ma respectueuse affection.

A MON AMI, LE DOCTEUR GEORGES ERHINGER

*qui nous a donné l'idée de
ce travail. Qu'il trouve
ici le remerciement de
ses conseils éclairés.*

AUX DOCTEURS BERGERON, HAUDUROY

ET A M. ANDRE LESURE

*qui ont favorisé notre tra-
vail en nous ouvrant
l'accès de leur laboratoire
Sincères remerciements,*

La détermination du P. H. des liquides a pris pendant ces dernières années une grande importance dans les recherches de chimie biologique et a conquis la faveur des physiologistes, mais cette méthode est jusqu'ici assez peu employée dans la pratique par les bactériologistes français. Alors qu'en Amérique elle est devenue d'un usage courant, elle ne pénètre que lentement dans nos laboratoires.

Cette défaveur tient à plusieurs causes. La recherche de la concentration en ions H est basée sur des principes encore peu familiers à beaucoup de médecins et il n'existe pas d'ouvrage dans notre langue qui donne les précisions techniques indispensables et les applications à la bactériologie.

D'autre part, comme il arrive avec toutes les méthodes nouvelles, les procédés d'applications se sont multipliés : au début, le choix des indicateurs était hérissé de difficultés, chaque auteur décrivant les siens et bien souvent on n'arrivait pas à trouver dans le commerce les produits recommandés.

Aujourd'hui, l'établissement de l'échelle de Clark et Lubs, les simplifications apportées par Barnett et Medalia et enfin la création par Bruère d'une échelle

stable ont rendu la méthode facilement applicable et, mettant fin aux tâtonnements, ont fixé la nomenclature de réactifs qu'il est aisé de se procurer.

Dans ce petit travail que nous nous efforcerons de faire vraiment pratique, nous ne nous attarderons pas à décrire les lois qui régissent les réactions des liquides et leur concentration en ions H. Nous nous bornerons à indiquer les diverses méthodes employées en nous efforçant de conserver celle qui nous semblera la plus utile dans le travail courant du Laboratoire.

CHAPITRE PREMIER

Pendant de longues années, on ne s'est servi pour mesurer la réaction des liquides provenant de l'organisme de l'homme et des animaux, que des méthodes titrimétriques qui ne nous renseignent que fort imparfaitement sur cette réaction.

En effet, elles nous indiquent en bloc les éléments basiques ou acides libres ou fixés par les albuminoïdes et mis en liberté par l'addition de solutions titrées.

La méthode titrimétrique est donc incapable de nous renseigner sur la réaction vraie, actuelle si l'on peut employer cette expression, et ne nous indique, en réalité, que la réaction que présenterait le liquide si ses acides ou ses bases fixées par les protéines étaient mis en liberté.

De plus, le pouvoir de fixation variant avec chaque albuminoïde, les résultats varient pour une même quantité d'élément libre actif, avec la composition du milieu, le chiffre obtenu étant d'autant plus éloigné

de la réalité que le pouvoir fixateur de l'albuminoïde est plus grand.

Ces causes d'erreur se trouvent supprimées par l'emploi de méthodes qui cherchent à déterminer la quantité d'ions H libres dans le liquide à mesurer, la concentration en ions H et que l'on représente par le symbole P.H. imaginé par Soerensen.

Pour mesurer le P.H. d'un liquide on peut employer deux méthodes :

La plus ancienne : la méthode électrique, est très rigoureuse, mais elle nécessite un appareillage coûteux, délicat, et pour être exacte, la présence d'un opérateur ayant une grande habitude des mesures électriques.

Dans la pratique on l'a à peu près abandonné aujourd'hui pour les méthodes colorimétriques beaucoup plus simples, plus rapides et dont l'application ne demande aucune connaissance spéciale.

Cependant, parmi celles-ci, si l'on envisage le travail habituel d'un laboratoire, un choix reste à faire.

Si l'on considère les méthodes utilisant des solutions tampons (*méthode de Clark et Lubs, méthode de Soerensen*) elles exigent l'emploi de sels très purs, de solutions salines étalons dont les composants doivent être exactement calculés, elles nécessitent une verrerie spéciale, l'emploi d'eau bi-distillée, de plus les échelles sont instables, il faut les renouveler fréquemment.

D'autres méthodes utilisent des échelles où ne figurent pas les solutions salines étalons, mais composées

uniquement d'indicateurs colorés (*méthode de Michaelis, méthode de Medalia*).

La *méthode de Michaelis* est inutilisable pour le bactériologiste qui, travaillant le plus souvent sur des milieux de cultures colorés en jaune, ne peut guère se servir d'indicateurs incolores dont le virage se fait en jaune.

La *méthode de Medalia* qui utilise les indicateurs de Clark et Lubs présente comme inconvénient le peu de stabilité de ses échelles.

L'emploi de planches colorées est peu recommandable, il est en effet très difficile de comparer la teinte d'un liquide transparent avec la teinte plate d'un tableau.

C'est pourquoi, désirant rester dans le cadre pratique, nous ne décrirons qu'une seule méthode qui nous semble la plus facilement applicable : la *méthode de Bruère* qui, tout en utilisant les indicateurs colorés de Clark et Lubs, pour le liquide à étudier, emploie des échelles stables parce que formées de sels minéraux.

MÉTHODE DE BRUÈRE

L'originalité de la méthode de Bruère consiste, ainsi que nous venons de le dire, dans l'emploi d'étalons colorés stables.

Bruère, à l'aide de solutions minérales colorées et judicieusement mélangées, obtient toutes les teintes correspondant aux divers virages du rouge de méthyle, du bleu de Bromothymol et du rouge de phénol.

Nous donnerons comme exemple la construction de l'échelle correspondant au bleu de bromothymol, indicateur le plus employé en bactériologie, ses virages extrêmes étant à cheval sur la neutralité, soit $\text{PH}=7$.

On commence par préparer les deux solutions suivantes :

Solution A. — Solution d'azotate de cobalt sec à $1/5$, 2 cc.

Solution de bichromate de potassium à 0,3 %, 98 cc.

Solution B. — Solution d'azotate de cobalt sec à $1/5$, 5 cc.

Solution de sulfate de cuivre cristallisé pur à $1/10$, 95 cc.

L'échelle est obtenue de la manière indiquée dans le tableau suivant :

P. H.	6,0	6,2	6,4	6,6	6,8	7,0	7,2	7,4	7,6
Sol. A.	8	7	6	5	4	3	2	1	0
Sol. B.	0	1	2	3	4	5	6	7	8
coloration jaune		jaune verdâtre		vert jaune		vert bleuâtre		bleu	

On emplit avec ces solutions neuf petits tubes de verre de même couleur et de même diamètre que l'on scelle ensuite à la lampe.

L'échelle étalon pour les virages au bleu de bromothymol est ainsi obtenue.

Deux autres échelles pour les virages du rouge de méthyle et du rouge de phénol sont également préparées.

Les indicateurs colorés qui doivent être ajoutés au liquide dont on veut déterminer le P.H. sont obtenus de la manière suivante :

Rouge de méthyle : en dissoudre 10 centigrammes dans 300 centimètres cubes d'alcool à 95°, puis ajouter après dissolution 200 centimètres cubes d'eau distillée. On a ainsi une solution à 0,02 pour 100.

Bleu de bromothymol : solution à 0,04 pour cent dans l'alcool à 50°.

Rouge de phénol : solution à 0,02 pour 100 dans l'alcool à 50°.

<i>Indicateurs</i>	<i>Virage</i>	<i>Limites du virage PH</i>	<i>Zone utile PH</i>
Rouge de Méthyle, O. carboxybenzène- azodiméthylaniline	rouge au jaune	4,4 à 6,0	4,4 à 6,0
Bleu de Bromothymol Dibromothymol sulfo- nephtaleïne	jaune au bleu	6,0 à 7,6	6,0 à 7,6
Rouge de Phenol Phénolsulfonephta- leïne	jaune au rouge	6,6 à 8,4	6,6 à 8,2

L'échelle de Bruère et les solutions d'indicateurs colorés se trouvent d'ailleurs tout préparés chez Poulenc.

CHAPITRE II

MESURE DE LA RÉACTION DES MILIEUX DE CULTURE ET AJUSTEMENT DE CES MILIEUX

L'ajustement de la réaction d'un milieu de culture peut se pratiquer d'après toutes les méthodes générales. Ici nous nous contenterons de la méthode de Bruère pour les raisons que nous avons exposées.

Toutefois, deux techniques peuvent être utilisées suivant qu'on dilue ou non le milieu à ajuster.

I. — *Ajustement d'un milieu sans dilution*

On choisit un tube à essai de même calibre et en verre de même épaisseur et de même nuance que les tubes employés pour la confection des étalons colorés. On y verse 5 cc. du liquide à ajuster, puis on ajoute 5 gouttes d'indicateur coloré.

Pour le choix de l'indicateur à employer : on ajoute à quelques centimètres cubes du liquide à ajuster quelques gouttes de bleu de bromothymol et suivant qu'il

vire plus ou moins fortement du jaune au bleu, on emploiera : le rouge de méthyle (si jaune), le bleu de bromothymol (si vert), le rouge de phénol (si bleu).

(N.-B. — Dans le cas où le liquide est naturellement coloré en jaune, utiliser le rouge de phénol, même si la touche d'essai a fourni une coloration verdâtre.)

Le tube ainsi préparé est placé dans le trou central d'un bloc comparateur à 6 trous à côté de l'étalon représentant le P.H. désiré, ou entre les deux étalons encadrant ce P.H.

Soit à obtenir un milieu de P.H. 7,0 on place à côté du tube contenant le milieu dont il s'agit l'étalon P.H. 7,0. Si l'on désire un P.H. de 7,1 comme un étalon de cette valeur n'existe pas dans les échelles, on encadre le tube dont l'acidité actuelle est inconnue par les étalons 7,0 et 7,2.

Avec une burette, on laisse alors tomber goutte à goutte dans le tube contenant le milieu, de la solution de soude N/20 jusqu'à ce que la teinte développée dans le tube soit identique à celle de l'étalon représentant le P.H. voulu.

Bien entendu, si le milieu est trop alcalin, on remplace la solution N/20 de soude par une solution N/20 d'acide chlorhydrique.

Un calcul simple donne la quantité de soude N/1 à ajouter à un litre de milieu pour l'amener à la concentration en ions-hydrogène cherchée.

Supposons que nous ayons opéré sur 5 centimètres

cubes de bouillon et que 1 centimètre cube de soude N/20 ait été nécessaire. Pour un litre, il faudra 200 centimètres cubes de soude N/20 ou 10 centimètres cubes de soude N/1.

Lorsque la quantité de soude normale reconnue nécessaire par litre de milieu est ajoutée, il est prudent de procéder à une nouvelle détermination du P.H., parce qu'il est rare que cette quantité, fixée par le calcul, coïncide exactement avec la quantité réellement nécessaire. Cette différence, le plus souvent minime, provient sans doute de l'existence de substances tampons qui, se combinant avec une partie de la soude, la détournent ainsi de la neutralisation de l'acidité.

Quand on utilise toujours, pour la confection d'un milieu la même technique en même temps que des produits strictement identiques — nous verrons plus loin pourquoi — on peut, à la rigueur, ajouter d'emblée la quantité de soude reconnue nécessaire dans les essais précédents, 10 centimètres cubes de soude N/1 dans l'exemple choisi plus haut; on se borne au deuxième titrage, pour ajouter le centimètre cube ou le demi-centimètre cube qui doit amener la réaction au point voulu.

En règle générale, on doit toujours ajuster la réaction d'un milieu à la température à laquelle ce milieu sera employé, 37° le plus souvent. On y arrivera par l'emploi de bain à température constante. On se souviendra que la neutralité absolue correspond à :

P.H..... 7,10 à 15°

P.H..... 7,00 à 20°

P.H..... 6,71 à 40°

Dans la pratique courante, on se contente de déterminer la concentration en ions hydrogène à la température du laboratoire.

Quoi qu'il en soit, il faut toujours que milieu à titrer et tubes étalons soient à la même température.

Pour les milieux liquides, l'ajustement est pratiqué comme nous venons de le dire.

Pour la gélatine, on opère en la maintenant fondue aux environs de 25°, sans risquer d'erreur appréciable.

En ce qui concerne les milieux gélosés, la meilleure méthode consiste à les ajuster avant d'y incorporer la gélose, l'addition de cette dernière n'exerçant aucune influence sur la réaction du milieu. Si on opère sur de la gélose maintenue en fusion vers 40° à 50°, la teinte de l'indicateur qu'elle contient n'est pas la même qu'à 20°, et ne peut se comparer utilement à celle de l'étalon maintenu à cette dernière température.

Fennel et Fischer, à ce propos, disent: « Les milieux à l'agar sont de préférence ajustés à l'état de bouillon et l'agar n'est ajouté qu'en dernier lieu. L'agar est pratiquement neutre et ne change pas le P.H. du bouillon. Dans le cas contraire, l'agar est fondu et titré chaud. En comparant les étalons colorés et l'agar, il

est préférable d'attendre que ce dernier soit solidifié avant de conclure à une identité de coloration. »

Quant aux produits riches en protéines, tels que sérum, liquide d'ascite, etc., deux cas sont à considérer : s'ils sont ajoutés aux milieux en proportions assez faibles (dilution au $1/4$, au $1/5$), on peut procéder comme pour les milieux liquides habituels. S'ils sont utilisés purs ou peu dilués, nous verrons que la détermination de leur P.H. par les méthodes colorimétriques ne donnerait que des résultats erronés.

Pour les milieux colorés ou troubles, voir plus loin, page 22, les diverses méthodes utilisables.

II. — *Ajustement d'un milieu après dilution*

La technique est la même que dans le cas précédent, mais le milieu dont il s'agit de déterminer le P.H. est dilué au $1/5$, soit un centimètre cube du milieu pour 4 centimètres cubes d'eau distillée.

Cette dilution, qui influe peu sur le P.H. du milieu, offre certains avantages; elle affaiblit la teinte du milieu et diminue par suite, dans de notables proportions, la formation d'une nuance nouvelle, par mélange de la couleur du milieu avec celle de l'indicateur, dont la nuance reste, par suite, plus pure et plus éclatante; elle permet de mesurer le P.H. de milieux riches en protéine.

En outre, on peut mesurer le P.H. de milieux gélifiés

même après l'incorporation de l'agar. Un centimètre cube de gélose (ou de gélatine) fondue, ajouté à quatre centimètres cubes d'eau distillée, reste fluide assez longtemps pour que soit possible la comparaison avec les étalons. Toutefois, il ne faut pas trop attendre : au bout de 20 minutes, la couleur du mélange gélose+eau distillée s'assombrit et sa comparaison avec les teintes étalons devient difficile.

L'eau employée pour diluer les milieux doit être de l'eau distillée bouillie et refroidie un peu avant l'usage, afin de chasser son anhydride carbonique et élever son P.H., le rapprochant de la neutralité.

La quantité de soude N/1 à ajouter à un litre de milieu se calcule de la même façon que dans le cas précédent en se rappelant seulement qu'on n'a opéré ici que sur un centimètre cube de milieu et non plus sur cinq.

Les procédés, décrits plus haut, concernent l'ajustement d'un milieu limpide ou très peu coloré. En présence d'un liquide coloré ou trouble, on opère ainsi qu'il est dit ci-dessous.

Liquide coloré. — On place dans le comparateur, derrière les étalons colorés, un tube de même calibre qu'eux, renfermant cinq centimètres cubes du liquide à étudier, de manière à annihiler les changements de teinte que la couleur propre du liquide à l'essai fait subir à la nuance de l'indicateur, puis on place der-

rière le tube contenant le liquide additionné de l'indicateur, un tube, toujours de même diamètre, plein d'eau distillée, pour égaliser les épaisseurs de liquide que doivent traverser les rayons lumineux.

Si le liquide est trop coloré on peut sans inconvénient le diluer au $1/2$, au $1/3$ et même au $1/5$, le P.H. changeant de façon inappréciable grâce à la présence de substances tampons que renferment tous les milieux de culture. Dans ce cas, les liquides des tubes placés derrière les étalons sont dilués au même titre que le liquide du tube en essai.

Liquide trouble. — Si le trouble n'est pas trop prononcé, on procède comme pour un liquide coloré avec ou sans dilution.

Dans certains cas, lorsque par exemple on veut rechercher le P.H. d'un milieu après culture d'un germe, on peut centrifuger et opérer sur le liquide clair surnageant.

Pour les liquides très troubles, on peut dialyser le milieu en sac de collodion et rechercher le P.H. du dialysat (voir lait, page 36).

On peut enfin employer la méthode de Henriquez (voir ci-dessous).

MÉTHODE DE HENRIQUEZ

Pour rechercher la réaction d'un tube de gélose inclinée, Henriquez conseille de répandre à sa surface

cinq centimètres cubes d'eau distillée, privée de CO_2 , attendre 45 minutes à 1 heure et de mesurer le P.H. de cette eau qui possède alors la même concentration en ions hydrogène que la gélose.

Pour les liquides troubles, culture microbienne, par exemple, ou trop colorés, on verse sur 5 centimètres cubes de gélose pure (nous donnons plus bas la manière de l'obtenir), stérile et inclinée en tubes capuchonnés pour éviter le contact de l'anhydride carbonique de l'air, cinq centimètres cubes du milieu dont on veut connaître la réaction. Au bout d'une heure, on évacue la culture ou le liquide coloré, on lave rapidement la surface de la gélose à l'eau distillée privée de CO_2 , puis on recouvre cette même surface de cinq centimètres cubes de cette même eau. Une heure après, on mesure le P.H. de cette dernière, qui est le même que celui du liquide trouble ou coloré versé dans le tube au début de l'expérience.

Gélose pure. — On enferme la gélose en brins dans un sac de gaze qu'on abandonne deux jours et deux nuits dans l'eau courante. Puis on la presse bien, et on la lave cinq fois à l'eau distillée, privée de CO_2 . Avec de l'eau distillée pure on en prépare une gelée à 4 % qu'on filtre dans le vide sur du coton hydrophile placé sur une toile métallique fine garnissant un entonnoir en tôle émaillée. On répartit en tubes et on stérilise.

Henriquez a fait l'expérience suivante : à de la gélose pure placée dans un certain nombre de ballons, on incorpore des mélanges de Sørensen variant en P.H.

de 1,03 à 9,76. Lorsque la gélose est solidifiée on répand à sa surface dans chaque ballon cinq centimètres cubes d'eau distillée sans CO^2 . Après 45 minutes de contact, on constate que dans les ballons dont le P.H. va de 4,5 à 9,76, l'eau ajoutée présente exactement la même réaction que la gélose placée dans chacun d'eux. Pour le ballon contenant des géloses plus acides, l'eau au contraire montre un P.H. un peu plus fort que le milieu solide, celui-ci fixant une légère quantité d'acide.

La gélatine, matière protéique, ne se comporte pas comme la gélose.

La gélose du commerce est le plus souvent blanchie au chlore. Lorsqu'elle sort de chez le fabricant, elle a une réaction acide P.H. 6 environ. Il faut donc la laver avec soin pour la rendre neutre et pouvoir l'incorporer aux milieux liquides sans qu'elle en modifie la réaction (voir plus haut, page 20).

MILIEUX SPÉCIAUX

Milieux sucrés. — Afin d'éviter un développement d'acides dans le milieu par désintégration des sucres au moment de la stérilisation, il est nécessaire d'ajouter les sucres au milieu après l'autoclavage et une fois le P.H. déterminé.

Gélose d'Endo. — L'acidité actuelle de ce milieu doit être calculée et l'ajustement doit avoir lieu au sortir

de l'autoclave et après avoir ajouté au milieu la solution lactosée et celle de fuchsine décolorée.

L'ajustement a lieu par addition de solution N/1 de $\text{CO}_3 \text{Na}^2$. Bunker et Schuber recommandent pour la détermination du P.H. de la gélose d'Endo d'utiliser la méthode sans dilution, c'est-à-dire d'opérer sur 5 centimètres cubes de gélose, avec de préférence le rouge de phénol comme indicateur. Ces auteurs, qui, d'habitude, préconisent la dilution au 1/5, trouvent que dans le cas présent la méthode sans dilution donne des résultats plus exacts.

Si on emploie le bisulfite de soude au lieu du sulfite pour décolorer la fuchsine, ce produit amène une réduction du P.H. de milieu, et on doit, pour arriver à la valeur désirée, ajouter plus de centimètres cubes de solution N/1 de $\text{CO}_3 \text{Na}^2$ que lorsqu'on utilise le sulfite.

Un séjour de 3 ou 4 jours à la glacière ne semble pas modifier le P.H. de la gélose d'Endo coulée en boîtes (Bunker et Schuber).

III. — *Influence de différents facteurs sur le P.H. d'un milieu*

Eau. — L'eau employée pour la confection d'un milieu est généralement de l'eau de conduite dont le P.H. peut être des plus variables. Néanmoins, grâce à l'existence de substances tampons dans le milieu de

culture, son influence sur la concentration en ions hydrogène de ce dernier est minime.

Bunker et Schuber placent dans une série A de tubes 10 centimètres cubes de bouillon lactosé de P.H. 6,9, et, dans une série B, 25 centimètres cubes du même bouillon.

Aux tubes A, ils ajoutent 1 centimètre cube d'une eau quelconque, et aux tubes B, 10 centimètres cubes de la même eau. Les eaux employées au cours des diverses expériences présentaient des P.H. allant de 4,9 à 8,1. Cependant, le P.H. du bouillon lactosé dans les séries A et B après addition d'eau, ne varie qu'entre 6,8 et 7,0.

Peptone. — Fennel et Fisher titrant plusieurs échantillons de peptonè en solution à 1 pour 1.000, trouvent les résultats suivants :

Peptone Witte.....	P.H. 7,
Peptone Armour's.....	P.H. 6,6
Peptone Difco.....	P.H. 7,3
Peptone Fairchild's....	P.H. 4,9

Bunker et Schuber préparent des fournées de bouillon en prenant :

Peptone	5 grammes
Extrait de viande de Liebig.....	3 grammes
Eau distillée (P.H. 6,4)	1.000 cc.

Foster et Randal ont trouvé que l'eau distillée de P.H. 4.8 voyait, après ébullition, ce P.H. passer à 6.8.

Pour chaque fournée, ils utilisent une marque de peptone différente. Les peptones dissoutes par chauffage à 65°, les bouillons furent filtrés, puis on déterminâ leur acidité actuelle à 29° (1). Voici quels furent leurs résultats.

<i>Marques de Peptone</i>	<i>P.H. du milieu (2 cc du milieu + 8 cc d'eau distillée)</i>	<i>Indicateur employé</i>
Bacto peptone	6.6	Bleu de Bromothymol
Witte	6.4	»
Merck	5.8	Rouge de Methylene
Fairchild's	5.7	»
Stearns	5.6	»

Variations de température. — Nous avons déjà signalé que pour des mesures exactes, il fallait opérer à la température d'utilisation du milieu. En effet, le P.H. d'un milieu est très influencé par les changements de température.

Un milieu de P.H. 6,6 à 70°, voit ce P.H. passer à 7,0 à 50°, à 7,4 à 25°, et à 7,6 à 20° (Cox et Wood).

Des tubes de bouillon ajustés à P.H. 7,0 à 30° placés par Bunker et Schuber à l'étuve à 37°5 présentent, au bout de vingt-quatre heures, un P.H. de 7,2.

(1) Température du laboratoire, les auteurs travaillant dans la zone du canal de Panama.

Autoclavage. — La stérilisation du milieu à l'autoclave apporte une certaine modification à la concentration en ions hydrogène du milieu.

Foster et Randall écrivent : « Du bouillon (infusion de viande, extrait de viande, bacto-beef) ajusté à des P.H. de 5,0 à 9,0 subit un changement de sa concentration en ions-hydrogène par l'autoclavage. Ce changement est le plus marqué pour les milieux alcalins (7,8-9,0), moins grands pour les milieux acides (5,0-6,2) et pratiquement inappréciable pour la zone neutre (6,6-7,4). La variation maxima est d'environ 0,4 et dans la majorité ne dépasse pas 0,2.

Le changement est habituellement une acidité augmentée (diminution du P.H.). Une diminution d'acidité a été observée dans quelques cas, mais exceptionnellement.

Du bouillon autoclavé subit un changement de concentration en ions-hydrogène avec le temps; le degré de ce changement n'est pas influencé par la température ambiante dans les limites de $+10^{\circ}$ (glacière) à $+37^{\circ}$ (étuve). Cette variation avec le temps est presque toujours dans le sens d'une augmentation de l'acidité.

Bunker et Schuber confirment le peu d'influence du passage à l'autoclave sur des milieux neutres ou à peu près (6,9-7,1).

Dernby constate de son côté que le P.H. du bouillon de viande qu'il a utilisé au cours de ses expériences pour la recherche de la réaction optima pour les dif-

férents germes, est changé par la stérilisation, mais revient à sa valeur primitive au bout de quelque temps.

	A	B	C
P.H. avant stérilisation.....	7,0	7,3	7,6
P.H. immédiatement après.....	7,3	7,6	8,2
P.H. 48 heures après.....	7,0	7,3	7,6

Le facteur le plus important de cette variation du P.H. semble être le départ de CO_2 sous l'action de la chaleur, et la rupture de l'équilibre entre carbonates, bicarbonates et anhydride carbonique dissous.

Accessoirement, il peut y avoir aussi élimination d'ammoniaque ou d'acides volatils; alcalinisation grâce à la désintégration des protéines par la soude et production d'ammoniaque; acidification par l'attaque des sucres par les alcalis, hydrolyse des albuminoïdes et mise en jeu de nouvelles quantités de substances tampons.

La précipitation des phosphates ne semble pas modifier beaucoup la réaction du milieu.

Le retour du P.H. à sa valeur primitive ou au moins aux environs de cette valeur s'expliquerait par la fixation du CO_2 atmosphérique, et rétablissement de l'équilibre entre ce gaz, les carbonates et les bicarbonates.

Quoi qu'il en soit, il sera toujours prudent de vérifier la réaction d'une fournée de milieu, immédiate-

ment après la stérilisation et 24 heures plus tard. On peut employer pour cela une prise d'essai et voir les modifications qu'elle subira par le passage à l'autoclave pour neutraliser en conséquence la fournée elle-même avant stérilisation.

Fennel et Fisher recommandent de disposer le tube échantillon ayant servi à l'ajustement du milieu contenant par suite l'indicateur utilisé pour cet ajustement à côté de la fournée pendant sa stérilisation, et de suivre sur ce tube les variations de la réaction.

Froid. — Le froid semble n'avoir qu'une action légère sur la réaction des milieux. Du bouillon lactosé de P.H. 7,0 après 7 jours à la glacière a accusé une augmentation légère de son acidité (P.H. 6,8-6,9). De la gélose ajustée à 6,9-7,1 après 15 jours dans la même glacière n'avait pas une réaction sensiblement modifiée.

INFLUENCE DES PROTÉINES

Certaines protéines forment avec l'indicateur ou ses composants des combinaisons qui entraînent la formation dans le liquide de teintes anormales.

Soerensen a constaté des erreurs de P.H. de 0,1 avec la mauvéine, de 1,40 avec le rouge Congo, en opérant avec des solutions à 2 pour 100 de peptone ou d'ovalbumine.

Les indicateurs de Clark et Lubs, quoique moins sensibles à cette cause d'erreur, n'en sont pas exempts. A. Omer, étudiant l'influence que le sérum non dilué peut avoir sur eux, arrive aux conclusions suivantes :

a) Le bleu de thymol et le rouge de crésol ne sont pas utilisables.

b) Le rouge de phénol donne des valeurs de P.H. différentes de 0,84 à 0,91 avec les valeurs obtenues par la méthode électrométrique; avec le bleu de bromothymol l'écart varie de 0,63 à 1,30.

c) Cet écart est constant avec chaque valeur de P.H. et peut être déterminé une fois pour toutes.

Une dilution de sérum au quart diminue dans de très larges proportions cette cause d'erreur.

INFLUENCE DE L'ACIDE CARBONIQUE

L'acide carbonique a une action très sensible sur les indicateurs de Clark et Lubs, et sa présence ou son absence dans un liquide peut faire varier notablement le virage de l'indicateur.

INFLUENCE DES SELS NEUTRES

En grande quantité dans le liquide à examiner, les sels neutres peuvent être une cause d'erreur non seulement parce que leur dissociation en leurs ions constitutifs modifie l'équilibre ionique de la solution elle-

même, mais aussi parce que ces ions sont susceptibles d'agir sur l'indicateur lui-même.

D'après Prideaux, des solutions-étalons obtenues par le mélange phosphate monopotassique+phosphate disodique, et renfermant 11 pour 100 de chlorure de sodium, donnent en présence de l'alizarine sulfonée une valeur de P.H. erronée de 0,26.

Soerensen et Palitzch, opérant avec une eau de mer, salifiée à 35 pour 1.000, relèvent une erreur de P.H. de -1 avec le rouge neutre, et de $+0,21$ avec la phénolphthaléine.

Cette cause d'erreur est réduite au minimum avec les indications de Clark et Lubs. D'ailleurs, elle n'existe que pour les solutions riches en sels, ce qui n'est guère le cas pour les solutions généralement utilisées en bactériologie.

INFLUENCE DE L'INDICATEUR LUI-MÊME

Certains indicateurs ne sont guère utilisables qu'aux alentours de leur virage, cette zone étant la seule qui donne des teintes nettement distinctes pour des variations minimales de la concentration en ions H. Plus on s'éloigne de cette zone, plus les changements de teintes deviennent faibles pour des variations importantes de P.H.

D'autre part, il ne faut pas que l'indicateur lui-même, introduit dans une solution, modifie le P.H. de

cette dernière. Cela est à craindre lorsque l'indicateur est un acide ou une base et si le liquide dans lequel on le place n'est pas une solution tampon.

Le P.H. de l'eau distillée ne peut, par exemple, pas être recherché avec un tel indicateur.

L'eau de rivière et l'eau de mer qui renferment de l'acide carbonique et des bicarbonates sont déjà des solutions tampons; leur P.H. peut-être déterminé par la méthode colorimétrique, surtout si l'on utilise des indicateurs doués d'un pouvoir colorant intense.

En définitive, cette dernière cause d'erreur ne risque guère de se rencontrer dans les solutions employées en bactériologie.

MESURES DU P.H. DE CERTAINS LIQUIDES ORGANIQUES

Sang. — En raison de la forte concentration en protéines du sang et du plasma, il convient, si l'on veut éviter de grossières erreurs, d'utiliser les méthodes électrométriques.

Toutefois, Cullen a obtenu des résultats satisfaisants en opérant de la façon suivante : recueillir du sang et le centrifuger, diluer le plasma obtenu dans 20 volumes de solution neutre de chlorure de sodium à 2 pour 1.000. On opère sur cette dilution en l'isolant sous une couche d'huile de vaseline (1).

(1) Si, à une température de t on a trouvé comme concentration en ions H Pht, pour avoir la valeur de cette concentration à 38° on utilise l'équation : $PH\ 38 = Pht - 0.01(38 - t)$.

Le sang humain présente un P.H. oscillant entre 7,3 et 7,5 avec une valeur moyenne de 7,4. Les valeurs extrêmes qui semblent les limites compatibles avec la vie sont 6,95 et 7,8 (Henderson, Hasselbach, Cullen, etc...).

Le sérum humain (sang veineux) a, d'après Michaelis, un P.H. de 7,6 à 7,7.

Liquide céphalo-rachidien. — Il faut opérer sur un liquide fraîchement recueilli ou conservé à l'abri de l'air. Une dilution au cinquième est suffisante.

Hurwits et Tranter ont trouvé que le liquide céphalo-rachidien normal a un P.H. de 8,15 à 8,30 avec une moyenne de 8,26. Le P.H. du liquide céphalo-rachidien d'un individu est toujours, d'après ces auteurs, supérieur de 0,45 au P.H. du sang de cet individu, prélevé au même moment.

Exsudats et transsudats. — S'ils sont riches en albumine, opérer comme pour le sang.

Urines. — Une dilution au cinquième est suffisante, sauf si les urines sont trop colorées. On pratique la mesure sur l'urine fraîchement émise.

Si on désire opérer sur les urines de 24 heures, on les recueille dans un récipient contenant 10 centimètres cubes de chloroforme thymolé à 5 pour 100, en ayant soin d'agiter après chaque miction. On recherche le P.H. le plus près possible de la dernière miction.

En expérimentant sur les urines de 24 heures de

sujets normaux, Henderson et Palmer ont obtenu les chiffres suivants :

Régime ordinaire (carné-végétarien) : P.H. 6,0;

Régime plus riche en protéiques (œufs) : P.H. 5,6 à 5,7;

Le régime végétarien élève au contraire le P.H.

Lait. — Le lait étant à peu près opaque, les méthodes colorimétriques cèdent le pas ici encore aux méthodes électrométriques.

Toutefois, Kramer et Green ont pu employer les indicateurs colorés en faisant dialyser, pendant au moins 5 minutes, 5 centimètres cubes de lait placés dans un sac de collodion plongé dans 6 centimètres cubes d'une solution neutre de chlorure de sodium à 9 pour 1.000. La mesure s'effectue facilement sur le dialysat.

Les auteurs trouvent pour le lait de vache un P.H. de 6,5 à 6,6 avec, comme valeurs extrêmes rares, 6,4 à 6,8,

Au moment de la coagulation, le lait présente un P.H. de 4,65 environ.

INFLUENCE DE LA RÉACTION DU MILIEU SUR LE DÉVELOPPEMENT DES GERMES

Depuis longtemps, on sait que les milieux de culture pour permettre aux microbes de se développer à leur surface ou à leur intérieur, doivent avoir une réaction neutre ou à peu près, réaction qu'on déter-

minait par la méthode titrimétrique avec le tournesol ou la phenolphtaléine comme indicateurs.

La mesure du P.H. des milieux permet aujourd'hui de préciser quelle est la réaction la plus favorable pour chaque germe en particulier.

Dans la pratique courante, on peut se contenter des données suivantes :

Eau peptonée et bouillons simples ou	
sucrés	P.H. 6,8 à 7,2
Gélose simple ou sucrée	P.H. 6,8 à 7,2
Milieu d'Endo	P.H. 8,0 à 8,2

Ce dernier milieu cependant, pour la recherche des bacilles dysentériques, doit avoir un P.H. de 7,5 à 7,8 (Kligler et Defandorfer).

Cette réaction varie avec les milieux utilisés.

Nous résumons ci-après les résultats obtenus jusqu'à ce jour par différents chercheurs. D'une façon générale, la zone des P.H. permettant le développement d'un germe est d'autant plus large que la nature du milieu et la température sont plus favorables au germe en expérience.

Staphylocoque doré. — Dernby, en bouillon de viande autolysé (1), trouve comme réactions limites,

(1) Dernby, au cours de ses recherches, a utilisé le milieu suivant : 1 kilog de viande finement hachée et plongée dans 2 litres d'eau ordinaire est maintenue à la température de 37° pendant 24 heures pour l'autolyse, ensuite bouillie et filtrée. On y ajoute 0,5 % de NaCl et 0,5 % de peptone. On stérilise 20 minutes à 110°.

entre lesquelles peut végéter ce germe, P.H. 5,6-8,1, et comme réactions optima 7,2 à 7,6.

Walburn donne comme limites, aux températures favorables P.H. 4,5-9,8 avec optima à 6,5. Aux températures défavorables, la zone de croissance est moins étendue. Toutes les cultures de staphylocoques dorés tendraient vers un P.H. final de 8,0 à 9,0.

D'après le même auteur, pour obtenir une staphylolysine d'activité maxima, on doitensemencer en milieu de P.H. 5,0; la lysine se forme surtout lorsque le P.H. passe à 6,0-7,0, à 40° qui est la température la plus favorable. La staphylolysine se conserve 6 jours à 40° en milieu de P.H. 6,0, mais est complètement détruite en milieu plus acide (P.H. 4,0) ou plus alcalin (P.H. 8,9). Sur gélose, bon développement à partir de P.H. 6,0 (Sierakowsky).

Staphylocoques divers. — En bouillon de viande autolysé (Dernby).

	<i>P.H. limites</i>	<i>P.H. optima</i>
Staphylocoque blanc	5,6-8,1	7,2-7,6
Staphylocoque Boucicaut.	4-8-8,0	7,0-7,6
<i>Staphylococcus néopfor-</i>		
<i>mans</i>	5,0-8,0	6,5-7,1

Streptocoques. — Dernby, avec son milieu, trouve pour *Streptococcus liquefaciens* : limites P.H. 5,5-8,0 avec optima 6,2-7,0.

Pour les Streptocoques hémolytiques et *Streptococcus viridans*, Fennel et Fisher donnent, en bouillon ordinaire, P.H. 7,6-7,8 comme réaction optima.

Avery et Cullen prétendent faire le diagnostic entre Streptocoques humains et Streptocoques bovins de la façon suivante :

Le streptocoque est ensemencé dans du bouillon glucosé à 1 pour 100 de P.H. 7,6. Après 24 à 48 heures, ils prennent 5 centimètres cubes de la culture, y ajoutent 10 centimètres cubes d'eau distillée, puis une goutte d'une solution alcoolique à 1 pour 100 de rouge de méthyle.

Avec un streptocoque humain on obtient un P.H. de 5 à 5,3, coloration saumon faible.

Avec un streptocoque bovin on obtient un P.H. de 4,3 à 4,5, coloration rouge Bordeaux.

Ces résultats ont été constants pour 124 streptocoques humains et 45 bovins.

Pneumocoques. — En milieu de Dernby, la zone de croissance est étroite, ayant P.H. 7,0 et 8,3 comme limites, avec 7,8 comme optima.

En bouillon ordinaire ou glucosé à 1 %, l'optima a cette même valeur (Fennel et Fisher, Avery et Cullen).

Du bouillon glucosé à 1 % et présentant une réaction initiale de P.H. 7 à 7,9 s'acidifie jusqu'à une concentration en ions H égale à P.H. 5,2-5,1, moment où la culture s'arrête. Si on réussit à maintenir le P.H. entre 6,8 et 7,4 par un artifice quelconque (addition

de carbonate de chaux par exemple), la culture peut survivre six mois (Lord et Nye).

Gonocoque. — Sur gélose ascite; limites : P.H. 6,0-8,3 avec 7,3 comme optima (Dernby et Heden).

En milieu de Vedda à l'amidon, l'optima est à peu près identique : P.H. 7,4-7,6 (Fennel et Fisher).

Meningocoque. — L'optima sur gélosé glucosée est P.H. 7,6 (Fennel et Fisher). Gates donne comme limites, sans préciser le milieu, P.H. 6,6 et 8 avec optima 7,4.

Micrococcus Melitensis. — En bouillon, les limites sont P.H. 5,8-8,8 avec optima à 7,6, valeur vers laquelle tendent les cultures primitivement plus alcalines ou plus acides.

Un mélitocoque, après plusieurs passages sur milieux acides, peut devenir inagglutinable; au contraire, un mélitocôque cultivé en milieu très alcalin, peut devenir agglutinable par des agents non spécifiques.

Les repiquages sur milieux alternativement acides et alcalins diminuent la vitalité du germe (P. Domingo)

Sur gélose simple, l'optima est P.H. 7,8 (Fennel et Fisher).

Coccobacille de Pfeiffer. — En bouillon de Dernby additionné d'extrait de globules rouges, les limites sont P.H. 6,2-7,6 avec optima à P.H. 7,0.

Sur milieu « chocolat » (sang laqué ajouté à de la gélose maintenue à 90°, l'optima est un peu plus alcalin P.H. 7,8 (Fennel et Fisher).

Bacillus pertussis. — Sur milieu au sang de Bordet et Gengou, il pousse bien entre P.H. 6,1 et P.H. 4,4. Pour l'isoler dans l'expectoration des malades, on choisira un milieu de P.H. 5 parce que cette acidité empêche la croissance des germes associés souvent aux bacilles de la coqueluche (Bacille de Pfeiffer, cocci divers) (O. R. Povitzky).

Bacterium pneumosintes. — Ce germe qu'Olitsky et Gates admettent être l'agent causal de la grippe pousse bien en anaérobiose en milieux de P.H. 7,4 à 7,8.

Colibacilles. — En milieu de Dernby, limites P.H. 4,4-7,8 et optima 6,0-7,0.

En eau peptonée, le colibacille ne pousse pas à P.H. 4,10 et 10,83. Le développement est minime à 4,67 et 9,53 et bon de 5,20 à 8,42 (Cluzet, Rochaix et Kofman).

Sur gélose, le colibacille pousse bien à partir de P.H. 6,0 (Sierakowsky).

Bacille typhique. — En milieu Dernby, les limites sont plus étroites que pour le colibacille P.H. 6,2-7,6 avec optima 6,8-7,2.

Sur gélose simple, l'optima est plus étendu P.H. 6,2-7,2 (Fennel et Fisher).

En bouillon de veau sans sel, Schoenholz et Meyer donnent comme limites P.H. 5,0-8,6 avec optima 6,8-7,0.

Bacille paratyphique A. — Les P.H. limites sont, en milieu Dernby, à peu près les mêmes que pour le colibacille 4,5-7,8, l'optima est plus restreint, P.H. 6,4-7,0.

En bouillon de veau non salé, les chiffres sont les mêmes que pour le bacille d'Eberth, mais la tolérance aux alcalins est un peu plus forte (Schoenholz et Meyer).

Sur gélose simple, voir plus haut : Bacille typhique.

Bacille paratyphique B. — En bouillon de viande autolysée, limites P.H. 4,5-8,0, optima P.H. 6,4-7,2.

En bouillon de veau sans sel et sur gélose simple, mêmes chiffres que le précédent.

En eau peptonée, le bacille paratyphique B ne pousse pas à P.H. 2,90 et 9,85, la culture est minime à P.H. 3,44 et 8,36 et bonne entre 3,90 et 7,20 (Cluzet, Rochaix et Kofman).

Bacille d'Aertryck. — En milieu Dernby, limites P.H. 5,0-8,2, optima P.H. 7,0-7,6.

Bacilles dysentériques. — Sur gélose simple, la réaction optima est comprise entre P.H. 6,2-8,4 (Fennel et Fisher).

En eau peptonée (renfermant par litre : peptone

Byla, 15 gr.; NaCl, 3 gr.; phosphate de soude, 2 gr.) Jonesco, Mihaesti et Popesco donnent comme limites pour la culture P.H. 5,4 et P.H. 9,1 avec 7,5 comme optimum. Pour la production de toxine, le rendement optimum est obtenu avec un P.H. initial de 8,4-8,5.

Vibron cholérique. — En milieu Dernby, limites P.H. 6,4-7,9 avec zone de 7,0-7,4 comme optima.

Sur gélose simple, Fennel et Fisher donnent comme zone optima celle qui est comprise entre les P.H. 6,2 et 9,0. Sierakowsky donne P.H. 7,0 comme la meilleure réaction pour obtenir une culture rapide et abondante.

Bacillus proteus. — En bouillon de viande autolysée, limites P.H. 4,4-8,4; optima P.H. 6,0-7,0 (Dernby).

Sur gélose, *Bacillus proteus* X19 pousse bien à partir de P.H. 6,0 (Sierakowsky).

Bacille pyocyannique. — Dernby pour son milieu donne comme chiffres limites P.H. 5,6-8,0, avec optima 6,6-7,0.

Bacille de la peste. — Toujours dans ce bouillon, limites P.H. 5,6-7,5 et optima P.H. 6,5-7,1.

Bacillus prodigiosus et *B. cinnabareus.* — En milieu Dernby, l'optima est pour le premier de ces deux germes, P.H. 6,0-7,0 avec comme limites P.H. 5,0-8,0; pour le *Bacillus cinnabareus*, P.H. 6,0-9,0, avec comme optima, P.H. 6,8-7,4.

Bacille de Loeffler. — En bouillon de veau peptoné, David et Dernby trouvent comme limites P.H. 6,0-8,4, avec optima entre 7,2 et 7,6.

Walburn, également avec du bouillon de veau peptoné, donne les chiffres suivants en fonction de la température.

Limites à 20° : P.H. 6,2-8,17.

Limites à 34° : P.H. 5,2-8,9, avec comme optima 7,0.

Limites à 40° : P.H. 5,9-7,9.

A la température de 36°, qui est la plus favorable avec un P.H. de 7,5, il y a production rapide d'un voile qui est complètement formé en trois jours, alors qu'au dessous de 5,6 il n'y a plus de formation de voile.

Walburn a également étudié l'influence de la réaction des milieux sur la production et la conservation de la toxine.

La toxine n'est très active qu'en milieu alcalin, la réaction optima étant une réaction du milieu de P.H. 7,2-7,3 avec comme limites extrêmes 6,5 et 8,0.

Avec une réaction initiale de P.H. 6,5-6,8, on obtient une toxine assez bonne.

Avec une réaction initiale de P.H. 6,3-6,5, on obtient une toxine faible.

Avec une réaction initiale de P.H. au-dessous de 6,3, on n'obtient plus de toxine.

David et Dernby arrivent à peu près aux mêmes résultats, réaction optima P.H. 7,9-8. Au-delà de 8,3, la toxine s'affaiblit.

Au point de vue de la conservation, Walbum établit que toute réaction s'écartant de la neutralité détruit la toxine.

A 37°, à P.H. 5,5 ou 9,3-10, la toxine disparaît complètement en 6 jours.

A 37°, à P.H. 7,4-7,6, elle se conserve bien, ne diminuant que de 25 %.

A 37°, à P.H. 6,0-6,1, la baisse est de 31,6 % pour une toxine recueillie depuis 14 jours.

A 37°, à P.H. 6,0-6,1, la baisse est de 43,5 % pour une toxine recueillie depuis un an.

A 37°, à P.H. 8,6-8,5, la baisse est de 33,3 % pour une toxine recueillie depuis 14 jours.

A 37°, à P.H. 8,6-8,5, la baisse est de 50 % pour une toxine recueillie depuis un an.

Bacille tuberculeux. — Pour un bacille tuberculeux cultivé en bouillon de viande autolysé pur ou additionné de glycérine. Dernby trouve : limites P.H. 6,0 et 7,6; optima P.H. 6,8-7,2.

Le milieu décrit par Boëz doit avoir un P.H. de 6,6.

Bacilles sporulés, en milieu de Dernby :

	P.H. limites	P.H. optima
<i>Bacillus anthracis</i>	6,8-8,5	7,0-7,4
<i>Bacillus anthracoides</i>	6,0-7,8	6,8-7,2
<i>Bacillus subtilis</i>	4,5-8,5	6,0-7,5

Itano et Neill ont étudié la germination des spores

de *Bacillus subtilis* en fonction de la température de la réaction.

A 5°, pas de germination.

De 25° à 37°, germination, de P.H. 5 à 10 avec optima P.H. 7-8.

A 25° et avec des réactions dysgénésiques (P.H. 5, ou 6, ou 9) la germination est d'abord lente. Pendant plusieurs heures, les bacilles sont immobiles, se multipliant lentement, puis deviennent plus actifs, se divisant rapidement, cependant que la germination devient générale, comme si, sous l'influence des premiers bacilles, le milieu avait subi une modification favorable.

A 25° avec P.H. 10, peu de spores germent et les bacilles qui ont pris naissance redonnent rapidement des spores.

Bacilles anaérobies, en milieu Dernby additionné de sulfure de calcium :

P.H. limites P.H. optima

Bacillus sporogenes, B.

histolyticus, B. perfrin-

gens, B. putrificus.... 5,8-8,5 6,0-7,6

Bacille tétanique 5,5-8,3 7,0-7,6

On obtient le maximum de toxine tétanique avec des P.H. compris entre 7 et 7,6, les P.H. limites étant 5 et 8,5.

La réaction optima pour sa conservation est P.H. 6,7. Au-dessous de P.H. 6, la toxine se détruit rapidement, au-dessus de 7, plus lentement (Dernby et Allander).

Bacillus botulinus. — En bouillon de veau concentré additionné de 2 pour 100 de peptone Difco, et renfermant comme substance tampons un mélange de phosphates, le P.H. optimum va de 6,0 à 8,2. La sporulation ne s'effectue qu'entre P.H. 6,0 et 7,2 (C. C. Dozier).

Bactériophage. — La lyse d'une culture de Bacille de Shiga en bouillon est très marquée à P.H. 8,5, légère à P.H. 7 et minima à P.H. 6,8.

Celle d'une culture de Colibacille intense entre P.H. 8 ou 8,5 est faible de P.H. 6,8 à 7,4 (A. Gratia).

Le bactériophage est tué en 2 heures, à 56°, à P.H. 4,5, mais dans un milieu de même P.H., il n'est pas altéré après de nombreuses heures à 20°-37° (E. Schneider).

Actinomycetes. — Après des recherches portant sur un grand nombre d'espèces, Naslund et Dernby ont trouvé que la croissance des divers Actinomyces et Streptothrix s'effectuait entre des limites de P.H. 5 et P.H. 9 avec comme optimum, P.H. 7,0-8,0.

Treponema pallidum. — C. Weiss et D. Wilker-Weiss donnent comme P.H. optimum pour la culture de ce parasite 7,6-7,8.

Cette légère alcalinité est nécessitée par l'acidification

des milieux qu'entraîne le développement du Tréponème.

Leishmania tropica. — En milieu de Noguchi, original ou modifié légèrement par lui, Kligler indique comme réaction optima P.H. 7-7,6; en deçà ou au-delà de ces chiffres, le parasite se développe beaucoup moins bien.

Schizotrypanum Cruzi. — En bouillon à 7 pour 1000 de chlorure de sodium et 5 pour 100 de peptone, le P.H. optima est de 6,5 à 7,2.

A P.H. 3,6 et au-dessous, le développement est nul. Au-dessus de P.H. 7,5, les parasites tendent à s'agglutiner (Magarinos Torres).

Spirocheta Icterohemorrhagiae, *Spirocheta hebdomadis*. — Développement abondant entre P.H. 5,45 et P.H. 7,21. P.H. limites : 4,65-8,19.

Amœba dysenteriae. — Les cultures commencent à P.H. 6,4.

L'optimum est P.H. 7,4 et les cultures continuent encore à P.H. 8,2 (Bœck et Drbohlav).

Action bactéricide des ions H. — Sierakowski et Miljkowska, pour rechercher l'action bactéricide des ions H, émulsionnent 2 milligrammes de culture sur gélose dans 2 centimètres cubes de solution de concentration en ions H déterminée.

Les solutions acides sont, soit celles de Clark (P.H. 1,2-5,8), soit des solutions acides N/50; les solutions alcalines sont obtenues par des mélanges de glycocolle et de soude; les tubes renfermant ces dernières sont soigneusement clos pour éviter le contact de CO atmosphérique.

Au bout de 24 heures d'abandon à la température du laboratoire, on vérifie la stérilité de chaque tube et son P.H., les résultats sont les suivants :

Concentrations mortelles en P.H.

Colibacille	3,8 et 10,02
Bacille d'Eberth.....	4,2 et 10,02
Bacille paratyphique A.....	4,0 et 10,45
Bacille paratyphique B.....	3,8 et 10,02
Bacille paratyphique C.....	4,1 et 10,95
Bacille de Danysz.....	4,4 et 9,63
Bacille de Gaertner.....	4,4 et 10,45

Bacille de Shiga.....	4,2 et 9,68
Bacille de Flexner.....	4,6 et 9,63
Bacille Y. de Hiss.....	4,4 et 9,63
V. cholérique.....	5,2 et 10,45
<i>Proteus</i> X 19.....	4,2 et 10,92
Pneumobacille de Friedlander.....	3,8 et 10,02
Bacille du rhinoclérôme.....	4,4 et 10,02
Bacille de l'Ozène.....	4,8 et 10,92
Bacille diphtérique.....	4,9 et 10,00
Bacille pseudo-diphtérique.....	5,3 et 11,31
Staphylocoque doré.....	3,9 et 12,2
Staphylocoque blanc.....	4,4 et 12,2
Staphylocoque citrin.....	4,1 et 11,92
Sarcine	4,6 et 12,2
Meningocoque	6,9 et 9,0
Bactéridie charbonneuse*.....	1,7 et 13,00
<i>Bacillus subtilis</i> *.....	1,7 et 13,00
<i>Bacillus mesentericus</i> *.....	1,7 et 13,00

Pour les espèces sporogènes, le signe * signifie qu'elles ne sont pas tuées après 24 heures aux concentrations indiquées.

La concentration bactéricide varie avec les espèces et est assez stable pour chacune d'entre elles.

La chaleur augmente son action. A 45°, le Colibacille meurt à P.H. 4,8 au lieu de 3,8, le Bacille typhique à P.H. 5,1 au lieu de 4,2.

Les germes tués par les solutions acides manifestent des propriétés antigènes marquées et fournissent plus d'anticorps que les germes tués par le phénol ou la chaleur.

CONCLUSIONS

1° Les méthodes titrimétriques ne sont pas suffisamment précises pour déterminer les réactions vraies d'un milieu et doivent céder le pas à la mesure du P.H.;

2° Pour la recherche du P.H. et l'ajustement des milieux de cultures, seules sont à conseiller comme vraiment pratiques les méthodes colorimétriques;

3° Parmi ces dernières, la plus recommandable est la méthode de Bruère à cause de ses échelles stables et de la facilité de son emploi;

4° Néanmoins, il faut reconnaître que la détermination du P.H. des milieux et leur ajustement comporte certaines causes d'erreur. Nous les avons énumérées et indiqué en même temps les moyens d'y remédier;

5° Pour la culture des germes et des parasites, et particulièrement pour les plus fragiles, le bactériolo-

giste devra toujours ajuster ses milieux aux P.H. optima exigés par ces germes ou ces parasites.

Nous avons indiqué ces P.H. pour les plus importants d'entre eux ainsi que les P.H. en deça et au-delà desquels ils cessent de se développer.

Vu : le Doyen,

ROGER.

Vu : le Président,

BEZANÇON.

Vu et permis d'Imprimer,

le Recteur de l'Académie de Paris,

CHARLÉTY.

BIBLIOGRAPHIE

ABT et LOISEAU. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1922.

G. ABT. — Mesure de la réaction P.H. par la méthode colorométrique dans les milieux de culture et les milieux biologiques. *Revue d'Hygiène*, janvier 1925.

V. AUGER. — Sur l'emploi des indicateurs colorés en acidimétrie et en alcalimétrie. *Bulletin Soc. Chimie de France*, 1921.

G.-D. BARNETT et H.-S. CHAPMAN. — Colorimetric determination of reaction of Bacteriology medium and other fluids. *Journ. Amer. Medic. Ass.*, 1918.

BRUÈRE. — Notation de la réaction vraie des milieux par le symbole de Sørensen ou indice P.H. *Arch. de Méd. et ph. milit.*, nov. 1924.

BRUÈRE. — Communication sur le nécessaire colorimétrique pour appréciation rapide du P.H. en zone alcalino-acide faible. *Soc. de Pharm. de Paris*, 2 juin 1926.

G. BUNKER and H. SCHUBER. — Reaction of culture media. *Journ. of. Americ. water works assoc.*, janvier 1922.

BÆCK et DRBOHLAV. — Cités dans Maurice Olivier, thèse de Lyon, 1928.

- W.-M. CLARK. — The determination of hydrogen-ion. Baltimore, 1920.
- W.-M. CLARK and LUBS. — The colorimetric determination of hydrogen-ion concentration and its application in Bacteriology. *Journal of Bacteriology*, 1917.
- Cox and Wood. — Bacteriological aspect of the the reaction of culture media. *The military surgeon*, 1920.
- DEBUCQUET. — Les mesures colorimétriques de l'acidité ionique, etc. *Archives de méd. et ph. militaires*, mars 1925.
- R.-G. DERNBY. — La concentration optima en ions H favorisant le développement de certains microorganismes. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1921.
- S.-R. DOUGLAS, EYRE, LAIDLAW et WOLF. — The reaction of culture media. *Publication du Medical research council*, 1927.
- R. FABRE. — Etude des méthodes nouvelles employées pour déterminer la réaction des solutions. *Journ. de Pharm. et Chimie*, 1922.
- FENNEL et FISHER. — Adjustment of reaction of culture medium. *Journ. Infect. dis.*, 1919.
- FOSTER et RANDALL. — Hydrogen ion concentration of broth media. *Journ. of bact.*, 1921.
- GUILLAUMIN. — Sur la détermination colorimétrique de la concentration en ions H des liq. biologiques. *Journ. de Pharm. et Chimie*, 1922.

- R. GOIFFON. — La notion d'acidité en biologie. *Presse médicale*, sept. 1924.
- HENRIQUEZ. — Compte-rendu de la Société de Biologie, 1922.
- KLIGLER. — Modification of culture media. *Journ. exp. med.*, 1918.
- KOPACZEWSKY. — Théorie et pratique des colloïdes en biologie et en médecine. *Vigot*, 1923.
- LASSIEUR. — Electrotitrimétrie. *Bull. Société Chimie de France*, sept. 1922.
- MEDALIA. — Color standards for the colorimetric measurement of hydrogen ion concentration. *Jour. of Bacteriology*, 1920.
- L. MICHAELIS. — Manuel de techniques de physico-chimie. *Masson*, 1923.
- RICHARD. — Méthode de détermination de la concentration en ions H au moyen du colorimètre. *Jour. de Pharm. et Chimie*, avril 1925.
- SÆRENSEN. — Ergänzung zu der Abhandlung Enzymstudien. *Biochem. Z.*, 1909.
- M. VINCENT. — La concentration en ions H, P.H. et sa mesure. *Annales des labor., clin.*, 1925.
- WALBUM. — *Bulletin de l'Inst. Pasteur*, 1922.
-

Imprimerie spéciale de la Librairie Marcel Vigné. — Paris.



